

SISTEMAS CAPILARES BASADOS EN LÍQUIDOS IÓNICOS PARA EXTRACCIÓN DE METALES

Grado en Ciencias Ambientales

FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR Y AMBIENTALES

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Curso 2015/2016

Autor: Josué Viejo Marín
Tutores: José Antonio López López
 Juan José Pinto Ganfornina

Puerto Real, 19 de septiembre de 2016

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. OBJETIVOS.....	5
3. ANTECEDENTES.....	6
3.1. Los metales traza en el medio ambiente.	6
3.2. Métodos de análisis de metales traza en aguas naturales.....	7
3.3. Microextracción en fase líquida con capilares de fibra hueca.	8
3.4. Líquidos iónicos con aplicación a la extracción de metales.	10
4. MATERIAL Y MÉTODOS	12
4.1. Reactivos y disoluciones.....	12
4.2. Materiales y equipos de medida.....	12
4.3. Preparación de material.	12
4.4. Desarrollo experimental.....	13
4.4.1. Procedimiento de microextracción con barras de disolvente.	13
4.4.2. Determinación instrumental.	14
4.4.3. Optimización.	14
4.4.4. Efecto de la salinidad y de la materia orgánica.	16
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	17
5.1. Estudios preliminares.....	17
5.2. Optimización de las variables hidrodinámicas.	17
5.2.1. Tiempo de agitación.	17
5.2.2. Velocidad de agitación.	18
5.3. Efecto de la inclusión del líquido iónico en la disolución orgánica.	18
5.3.1. Estudios de solubilidad del líquido iónico.....	19
5.3.2. Condiciones en la disolución orgánica.	19
5.4. Efecto de la salinidad y de la materia orgánica.	21
5.4.1. Efecto de la salinidad en la muestra.	21
5.4.2. Efecto de la materia orgánica en la muestra.	22
6. CONCLUSIONES	25
7. BIBLIOGRAFÍA.....	26

RESUMEN

La determinación de metales traza como el cobre en aguas naturales, presenta una serie de limitaciones, debido a su baja concentración y al efecto matriz de la muestra. Esto hace que, de forma general, sea necesaria una etapa de preparación de las muestras previa a la determinación instrumental, como la extracción líquido-líquido. Esta técnica presenta inconvenientes debidos a un empleo excesivo de disolventes, bajos factores de preconcentración del analito y excesiva manipulación de las muestras. Una alternativa para mejorar las características de estos sistemas es su miniaturización, para aumentar la preconcentración del metal, y disminuir el exceso de reactivos empleados, en lo que se conoce como microextracción líquida (LPME).

Existen diferentes tipos de microextracción líquida, de entre los cuales se eligió y empleó para este trabajo la microextracción en fase líquida con capilares de fibra hueca (HF-LPME). El sistema emplea un soporte polimérico microporoso que separa la muestra y unos pocos microlitros de disolución acuosa receptora. El transporte tiene lugar a través de los poros de la pared, que alberga una disolución orgánica a modo de membrana líquida soportada. A pesar del potencial de la técnica, presenta una serie de limitaciones: montaje complejo, baja estabilidad y prolongados tiempos de ensayo. Sin embargo, existen diferentes alternativas como el uso de la técnica en una configuración de barras de disolvente (SBME) o el uso de nuevos sistemas de reactivos, como los líquidos iónicos, que permiten mejorar su aplicabilidad.

Para la preconcentración de cobre se ha utilizado di-2-piridilcetona-benzoilhidrazona (DPKBH) disuelto en octanol, como disolución orgánica o membrana líquida, en un sistema SBME. El objeto de este trabajo es evaluar si la adición del líquido iónico hexafluorofosfato de 1-hexil-3-metilimidazolio ([Hmim][PF₆]) a la disolución orgánica favorece el transporte de cobre libre (Cu²⁺). También se evaluó su aplicabilidad, teniendo en cuenta el efecto de la salinidad y la concentración de materia orgánica en la muestra sobre el transporte de cobre.

Finalmente, el líquido iónico no tuvo efecto en el transporte de cobre al incluirlo en la disolución orgánica. Con este sistema se obtiene un factor de enriquecimiento (F.E.) de $79,46 \pm 4,98$ independientemente de la salinidad de la muestra. La presencia de materia orgánica provocó una disminución del F.E., mostrando una relación lineal que permite estimar la fracción libre de cobre en la muestra, y el cobre total de forma indirecta.

ABSTRACT

The determination of trace metals such as copper in natural waters, presents several limitations because of its low concentration and the sample matrix effect. This means that a preparation step (as liquid-liquid extraction) is required before the instrumental determination of copper in the samples. This technique is disadvantageous due to excessive use of solvents, low analyte preconcentration factors and excessive sample handling. An alternative to improve the characteristics of these systems is their miniaturization, to increase the preconcentration of the analyte and to reduce the excess of reagents. It is known as liquid phase microextraction (LPME).

There are different types of liquid phase microextraction. Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction (HF-LPME) was selected and employed for this work. The system employs a microporous polymeric support that separates the sample and a few microliters of aqueous receiving solution. Transport occurs through the pores of the fiber's wall, containing an organic solution as a supported liquid membrane. Despite of the potential of the technique, it presents some limitations: complex assembly, low stability and long test times. However, there are different alternatives such as the Solvent Bar Microextraction (SBME) or using new reagent systems, as ionic liquids, which improve its applicability.

For copper preconcentration, di-2pyridylketone benzoylhydrazone (dPKBH) dissolved in octanol as organic solution has been used in a solvent bar configuration (SBME). The objective of this project is to evaluate if the addition of 1-hexyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ([Hmim][PF₆]) in the organic solution will favor the free copper transport (Cu²⁺). Additionally, it was evaluated the effect of salinity and organic matter concentration on copper transport.

Finally, the ionic liquid included in the organic solution showed not effect on the copper transport. With this method an enrichment factor of $79,46 \pm 4,98$ is obtained regardless of the sample salinity. The presence of organic matter reduced E.F., showing a lineal relation that allowed to estimate the fraction of free copper in the sample, and while total copper was indirectly estimated.

1. INTRODUCCIÓN

Los metales traza presentan una gran importancia en los ecosistemas, en particular en las aguas naturales. Muchos de ellos son tóxicos para los seres vivos incluso a muy bajos niveles de concentración, mientras que otros son esenciales para algunos procesos bioquímicos. Sin embargo, los metales esenciales también presentan toxicidad a concentraciones superiores a las que son requeridas. Debido a esto, es importante poder determinar sus concentraciones en las aguas naturales.

La determinación directa de metales traza en ecosistemas acuáticos presenta una serie de limitaciones, especialmente en agua de mar, como la baja concentración a la que se encuentran y el efecto matriz de la muestra. Por tanto, y de forma general, es necesaria una etapa previa de preparación de la muestra, para solventar estas limitaciones. Existen diferentes técnicas capaces de conseguirlo como las extracciones en fase sólida (SPE), y las extracciones líquido-líquido (LLE) que se han empleado de forma tradicional.

La extracción líquido-líquido se basa en la diferencia de solubilidad del analito entre dos disoluciones inmiscibles entre sí que se ponen en contacto, es decir en la afinidad del analito por una disolución u otra, que provoca su migración hacia la disolución extractante. El caso en el que el analito sea un metal es necesario un agente quelatante disuelto en la disolución orgánica extractante, que sea capaz de complejar selectivamente el ión metálico para que dicha molécula sea más afín a disolverse en la fase extractante. Posteriormente se realiza una reextracción del metal hacia una fase acuosa para su determinación instrumental. No obstante, esta técnica presenta una serie de limitaciones: un uso excesivo de disolventes, una baja preconcentración y excesiva manipulación de la muestra.

Con el objetivo de miniaturizar la cantidad de residuo generado y aumentar la preconcentración del metal, se han desarrollado las técnicas de microextracción líquida. Estos sistemas emplean volúmenes de microlitros de disoluciones, permitiendo por tanto mayor preconcentración del analito y una menor generación de residuos. Existen diferentes técnicas de microextracción como: microextracción líquida de gota colgante (SDME), microextracción líquida-líquida dispersiva (DLLME) y microextracción en fase líquida con capilares de fibra hueca (HF-LPME). La técnica empleada en este trabajo es la HF-LPME usada en una configuración en tres fases, ya que utiliza tres tipos de disoluciones. Consiste en un soporte físico microporoso e hidrófobo, donde el

metal es preconcentrado en una disolución acuosa receptora en el interior de la fibra. El ión metálico es transportado desde la muestra hacia la disolución receptora a través de un extractante disuelto en un disolvente orgánico, localizado en los poros de las paredes de la fibra, que mantiene separada la fase cargada de la receptora. Esto permite la determinación instrumental del metal en la disolución receptora, pudiendo emplear técnicas espectroscópicas.

A pesar del potencial de la técnica HF-LPME, presenta limitaciones como un montaje complejo, baja estabilidad y prolongados tiempos de ensayo. Para ello, existen diferentes alternativas o configuraciones como el sistema de barra de disolvente en 3 fases (3PSBME). Esta configuración otorga al sistema una mayor estabilidad y facilidad de manejo, además de emplear menor cantidad de disolución receptora.

Durante los últimos años se han llevado a cabo estudios que pretenden la sustitución de los disolventes orgánicos convencionales por otros que aumenten la eficacia de separación y preconcentración, para mejorar la estabilidad del sistema de microextracción. Entonces, se comenzaron a utilizar los líquidos iónicos. En este sentido, los líquidos iónicos son sales líquidas orgánicas a temperatura ambiente, las cuales presentan una mayor estabilidad térmica, menor volatilidad y mayor viscosidad. Estas propiedades les confieren una serie de ventajas frente a los disolventes orgánicos tradicionales, como una mayor capacidad de retención de la disolución orgánica en los poros del capilar.

En este trabajo se ha evaluado el efecto del líquido iónico hexafluorofosfato de 1-hexil-3-metilimidazolio ([Hmim][PF₆]) sobre el transporte de cobre con di-2-piridilcetona-benzoílhidrazona (dPKBH). Para ello, se emplea como aditivo a la disolución orgánica que contiene como agente transportador dPKBH disuelto en octanol. Esta disolución impregna los poros de los capilares de fibra hueca en un sistema 3PSBME, para la microextracción de cobre.

2. **OBJETIVOS**

El objetivo general del presente trabajo es evaluar si el uso de hexafluorofosfato de 1-hexil-3-metilimidazolio ([Hmim][PF₆]) como aditivo a la disolución orgánica en los poros de los capilares de fibra hueca, para microextracción líquida de cobre con dPKBH en muestras acuosas, tiene efecto en el transporte. Para poder conseguirlo, se establecieron las siguientes etapas u objetivos parciales:

- Optimización de las condiciones hidrodinámicas de microextracción líquida con capilares de fibra hueca en una configuración de barra de disolvente en tres fases (3PSBME), utilizando el di-2-piridilcetona-benzofihidrazona (dPKBH) como agente transportador, disuelto en 1-octanol.
- Evaluación de la adición [Hmim][PF₆] sobre la preconcentración de cobre.
- Evaluar el efecto de la salinidad y la concentración de materia orgánica de las muestras sobre la eficacia en la preconcentración de cobre, en presencia y ausencia de [Hmim][PF₆] en la disolución orgánica.

3. ANTECEDENTES

3.1. Los metales traza en el medio ambiente.

En los ecosistemas acuáticos se presentan los diferentes elementos químicos de forma natural, y en función de la concentración en la que aparezcan en la masa de agua, se pueden clasificar en elementos mayoritarios, minoritarios y trazas [1]. Dentro de los elementos traza se incluyen metales como Co, Ni, Cu, Cr, Zn, Pb, etc. Estos intervienen dentro de los ciclos biogeoquímicos [2], pudiendo ser asimilados por los organismos que se desarrollan en ese ambiente. Para los seres vivos, los metales pueden ser considerados como elementos esenciales o no esenciales, siendo estos últimos tóxicos incluso a muy bajas concentraciones [3], pudiendo provocar daños e incluso la muerte celular, como la enfermedad de *Itai-Itai* [4] o el *Saturnismo* [5].

La importancia de los metales esenciales en los organismos está contrastada debido a que intervienen en diversos procesos biológicos, y son considerados como oligoelementos. Sin embargo, a determinados niveles dentro del organismo, estos metales pueden llegar a causar toxicidad. Esto es posible ya que se pueden dar procesos de bioconcentración y biomagnificación a lo largo de la cadena trófica [6].

Conjuntamente a las concentraciones naturales, hay que añadirles las que resultan de las actividades antropogénicas, cuyos niveles pueden llegar a causar efectos adversos sobre los ecosistemas y/o en la salud humana. Debido a todas estas razones, es importante conocer las concentraciones de estos metales en el medio ambiente.

El metal seleccionado para este trabajo es el cobre. En general, el cobre tiene valor humano a nivel industrial y doméstico, ya que se trata de un metal con múltiples características al ser un excelente conductor, resistente a la corrosión, maleable, dúctil, etc. No obstante, también es un elemento esencial a bajas concentraciones, y por eso la importancia de poder cuantificar las concentraciones en las que se encuentra en el medio ambiente. Tiene funciones importantes en los seres vivos: participa en el transporte de oxígeno, en actividades redox, y como cofactor de enzimas o metaloenzimas como la Ceruplasmina (Cu) o la Ferroxidasa I [7]. Sin embargo, puede presentar toxicidad a determinadas concentraciones [8]. Por diferentes mecanismos puede llegar incluso al ser humano, causando trastornos fisiológicos como la enfermedad de Wilson [9].

Debido a esto, es importante poder determinar la concentración de cobre en los ecosistemas acuáticos. Además, está reconocido como una sustancia peligrosa, y en lo que se refiere al ámbito de la política de aguas, está recogido por la ley según la Directiva 2008/105/CE [10]. Dicho metal se encuentra a unas concentraciones medias en ríos y lagos de $4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, y en agua de mar en torno a $0,15 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ [11].

3.2. Métodos de análisis de metales traza en aguas naturales.

La determinación de metales traza en aguas naturales, incluyendo el agua de mar, presenta una serie de limitaciones [12], siendo las más importantes la complejidad de la matriz de la muestra, cuyos compuestos pueden enmascarar al analito e interferir en la cuantificación del metal, y las bajas concentraciones que presentan en el medio.

Por lo tanto, es necesario que se lleve a cabo la separación y/o preconcentración del analito. Esto se consigue a través de una preparación previa de la muestra. Así cabe mencionar la co-precipitación con hidróxido de magnesio [13], la extracción en fase sólida usando resinas quelatantes [14, 15] o la extracción líquido-líquido [16, 17]. De todas estas, la extracción líquido-líquido ha sido una de las más utilizadas, también para la extracción de cobre en agua de mar [18].

La extracción líquido-líquido (LLE) consiste en un proceso de separación del analito de interés en una disolución, mediante su distribución en dos fases líquidas inmiscibles hasta alcanzar el equilibrio. Se basa en la diferencia de solubilidad del analito entre ambas disoluciones, es decir, el soluto tiene afinidad por una de las dos disoluciones que se ponen en contacto. En el caso de la LLE de metales es necesario utilizar un reactivo que compleje el metal para poder encontrarse en forma soluble en la disolución orgánica, ya que los iones metálicos son insolubles en fases orgánicas. Posteriormente es necesaria la reextracción en una nueva disolución acuosa para su determinación instrumental efectuando el mismo proceso. Sin embargo, la LLE presenta una serie de inconvenientes, como el gasto excesivo de volumen de muestra, disolventes o reactivos, baja preconcentración del analito y una excesiva manipulación por parte del analista. Con el objetivo de solventar estos inconvenientes, para miniaturizar la cantidad de residuos generados y aumentar la preconcentración del metal, se desarrollaron las técnicas de microextracción en fase líquida (LPME).

3.3. Microextracción en fase líquida con capilares de fibra hueca.

La microextracción líquida es una miniaturización de la LLE, que supone una aproximación a los principios de la Química Verde [19], ya que se emplea menos volumen de muestra y de disoluciones para llevar a cabo los ensayos [20].

Existen diferentes técnicas de microextracción líquida [21]: microextracción líquida de gota colgante (SDME), microextracción líquida-líquida dispersiva (DLLME) y microextracción en fase líquida con capilares de fibra hueca (HF-LPME), siendo esta última la que se ha utilizado en este trabajo.

En la técnica de HF-LPME (figura 1) se emplea un soporte físico en forma de capilar hueco y microporoso de polipropileno, para separar la muestra y la disolución receptora. En los poros se encuentra la disolución orgánica con el agente quelatante que permite el transporte de cobre a modo de membrana líquida. Esto se conoce como configuración de 3 fases (3HF-LPME) [21]. En un sistema químico de 3 fases, la disolución orgánica mantiene separada la disolución cargada (muestra) de la disolución receptora confinada en el interior del capilar. Ambas son de naturaleza acuosa e inmiscibles con la disolución orgánica. El transporte se basa en los principios de las membranas líquidas soportadas [22]. El paso del metal tiene lugar a través de la disolución orgánica (que actúa como membrana líquida), que por acción del agente quelatante forma complejos con el ión metálico, provocando que sean más solubles en la disolución orgánica que en la muestra. Posteriormente, el complejo se disocia al entrar en contacto con la disolución receptora del lumen de la fibra, quedando retenido el metal en el interior de la misma [23]. Por tanto, la extracción y re-extracción del analito se realiza de forma simultánea. Finalmente, la cuantificación del metal en la disolución receptora puede ser realizada a través de técnicas espectroscópicas. La técnica instrumental empleada en este trabajo es la espectrofotometría de absorción atómica de llama (FAAS) [24].

Gracias a esta técnica, se consigue una mayor preconcentración selectiva del metal, ya que la diferencia de volúmenes entre la muestra y la disolución receptora es de varios órdenes de magnitud, siendo esta última de unos pocos microlitros. Además, se aísla el metal eliminando el efecto matriz de la muestra, y se disminuye la manipulación por parte del analista.

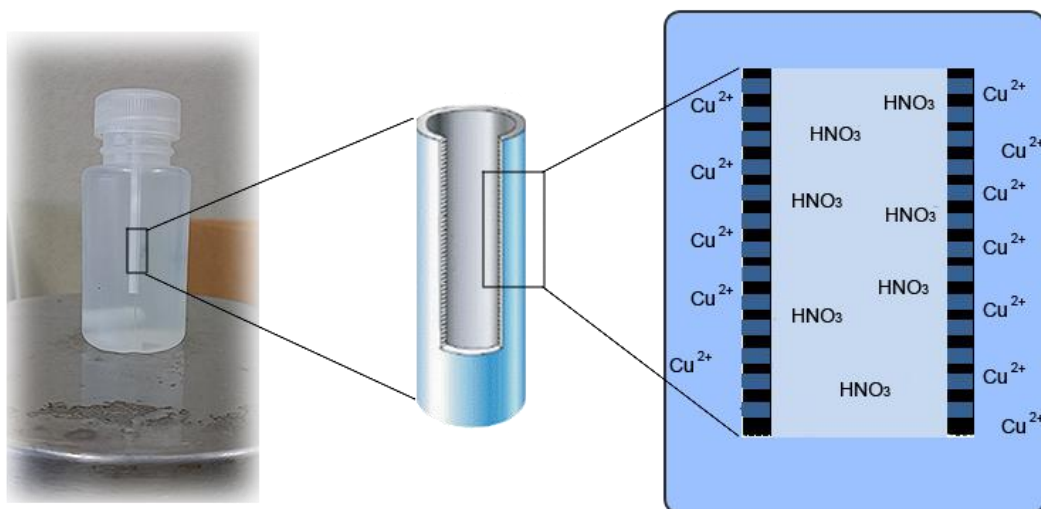


Figura 1. Esquema de un sistema de microextracción en fase líquida con capilar de fibra hueca

Existen diferentes configuraciones para los sistemas de HF-LPME. Tradicionalmente se han empleado las fibras sujetas con microjeringa: puede ser en forma de “U”, utilizando dos microjeringas para sellar los extremos, o en forma de barra con sólo una microjeringa y el otro extremo sellado térmicamente [25]. Esto provoca que los capilares estén sujetos durante el periodo de microextracción.

Sin embargo, a pesar del potencial de las configuraciones tradicionales de HF-LPME, presentan una serie de limitaciones como un montaje complejo, baja estabilidad y prolongados tiempos de ensayo. Para ello, hay diferentes alternativas como el empleo de sistemas de barras de disolvente (SBME) (figura 1) [26]. Este sistema sella térmicamente los extremos del capilar, manteniendo confinada la disolución receptora en el interior, y por tanto la fibra se puede dejar libre en el seno de la muestra. Le permite obtener una mayor estabilidad que el sistema tradicional de HF-LPME, además de emplear menor cantidad de disolución receptora.

La configuración utilizada en este trabajo es el sistema de barra de disolvente en tres fases (3PSBME) empleando un sistema químico con el agente quelatante di-2-piridilcetona-benzoílhidrazona (dPKBH) para la extracción de cobre libre (Cu^{2+}). El dPKBH actúa mediante un mecanismo de contratransporte acoplado, como se observa en la figura 2 [27], donde el paso del cobre desde la muestra hacia la disolución receptora está favorecido por un contratransporte de protones en sentido contrario. El dPKBH libera protones a la muestra cuando reacciona con el cobre, formando un complejo en los poros de la fibra. Seguidamente se transporta hacia el interior del

capilar donde se disocia al entrar en contacto con la disolución receptora cargada de protones. Esto permite que el agente quelatante se regenere, volviendo a transportar cobre hacia el interior de la fibra. El dPKBH extrae de forma selectiva el cobre en forma iónica (Cu^{2+}) [28].

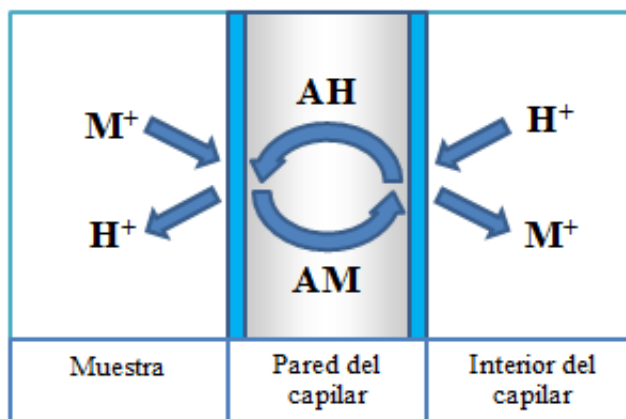


Figura 2. Esquema del proceso de contratransporte acoplado.
(M: soluto, A: extractante, H: protón)

Se ha seleccionado el dPKBH porque funciona a pH 8, que es el valor que presenta el agua de mar. Sin embargo, el extractante empleado en este trabajo no es el único capaz de transportar este metal, sino que existen otros capaces de lograrlo como el agente quelatante DEHPA disuelto en keroseno [12].

3.4. Líquidos iónicos con aplicación a la extracción de metales.

Una de las limitaciones de la LPME es la baja estabilidad, debido a que la disolución orgánica no se mantiene completamente retenida en los poros, y a los tiempos elevados de extracción [29]. Para evitar esto, se han incorporado recientemente los líquidos iónicos a los sistemas de microextracción. Estos están siendo utilizados debido a que se presentan como una alternativa a los disolventes convencionales. Son sales orgánicas líquidas cuyo punto de fusión es inferior a temperatura ambiente, considerando como límite 100°C [30]. Sus características físico-químicas únicas, que dependen de la naturaleza y el tamaño de sus constituyentes aniónicos y catiónicos, le otorgan un alto poder extractante. Estas incluyen una presión de vapor minúscula o baja volatilidad, alta estabilidad térmica, y una viscosidad e hidrofobicidad ajustable. Además, se requieren pequeños volúmenes para su uso, enmarcándolos dentro de los criterios de la Química Verde.

Los líquidos iónicos se han utilizado en microextracción SDME, DLLME y HF-LPME, como aditivo al disolvente orgánico, para potenciar el transporte de las especies químicas. Se han empleado en la detección de compuestos orgánicos en el medio acuático, como drogas o productos farmacéuticos, para su determinación instrumental a través de cromatografía [31]. También se han aplicado en la cuantificación selectiva de especies metálicas [32].

En este trabajo, se utilizó el líquido iónico hexafluorofosfato de 1-hexil-3-metilimidazolio ([Hmim][PF₆]). Este líquido iónico ha sido empleado en disoluciones orgánicas, junto a un agente quelatante, para potenciar el transporte de plomo y níquel en la técnica de HF-LPME [33, 34].

En el caso del cobre, existen diversos estudios sobre su extracción empleando diferentes líquidos iónicos [35, 36]. Por ejemplo, en la aplicación del líquido iónico hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazolio ([Hmim][C₄P₆]) se obtuvieron factores de preconcentración elevados, junto con la respectiva validación del método aplicado para la determinación de cobre en alimentos y en agua [35].

El presente trabajo ha evaluado si el uso de [Hmim][PF₆] como aditivo a la disolución orgánica en los poros de los capilares de fibra hueca en un sistema 3PSBME, para microextracción líquida de Cu²⁺ en muestras acuosas, tiene un efecto potenciador en el transporte. Además, se estudió el efecto de la salinidad y de la concentración de materia orgánica en la muestra sobre la eficacia en la preconcentración de Cu²⁺ en presencia y ausencia de [Hmim][PF₆] en la disolución orgánica, para la potencial aplicación del sistema de extracción al análisis de cobre en agua de mar.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Reactivos y disoluciones.

Para la preparación de las diferentes disoluciones empleadas en cada uno de los distintos experimentos, se utilizaron los siguientes reactivos:

Cloruro de sodio 99% para análisis obtenido de Cosela (Sevilla, España). Benzoíhídrica 98% suministrado por Ega-Chemie (Steinheim/Albuch, Alemania). Disolución estándar de $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ cobre adquirido de Merck (Madrid, España). Ácido clorhídrico 37%, ácido nítrico 65% y etanol 96% para análisis proporcionado por Panreac (Barcelona, España). Acetona 99,5%, hidróxido de potasio 85% en lentejas e hidróxido de sodio 99% en lentejas para análisis obtenido de Scharlau (Sentmenat, España). 1-Octanol 99%, N,N-dimetilformamida 99%, Hexafluorofosfato de 1-hexil-3-metilimidazolio 97%, sal sódica de ácido húmico y di(2-piridilcetona) 99% para análisis adquirido de Sigma-Aldrich (Madrid, España). Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il-etanosulfónico (HEPES) para análisis suministrado por VWR (Barcelona, España).

4.2. Materiales y equipos de medida.

Los capilares de fibra hueca utilizados fueron Accurel PP S6/2 adquiridos de Membrana (Wuppertal, Alemania). Estas presentan un grosor de pared de $450 \pm 50 \text{ } \mu\text{m}$, un diámetro interno de $1800 \pm 150 \text{ } \mu\text{m}$, una porosidad del 72% y un tamaño de poro de $0,2 \text{ } \mu\text{m}$.

Las medidas de pH se realizaron usando un pH-metro modelo Basic 20+ de Crison (Barcelona, España). Para la optimización de los sistemas, durante la extracción se utilizaron agitadores modelo Agimatic-SD de J.P. Selecta S.L. y big-squid White de IKA (Staufen, Alemania).

Finalmente, para la cuantificación de cobre en la disolución receptora se utilizó un espectrofotómetro de absorción atómica de llama modelo ContrAA 700 de Analytik Jena (Jena, Alemania), equipado con un quemador de 50 milímetros, provisto con una fuente de radiación de lámpara de arco de xenón.

4.3. Preparación de material.

Para evitar la contaminación de cobre en el material se siguió el siguiente protocolo general de limpieza:

- 1) Enjuagado con agua Milli-Q.
- 2) Lavado con ácido nítrico 3M.

- 3) Enjuagado con agua Milli-Q.
- 4) Secado en campana.
- 5) Almacenamiento en bolsas de plástico herméticas y etiquetadas.

En el caso en que dicho material tuviera restos de compuestos orgánicos, antes de realizar el protocolo general se procedía a una limpieza abrasiva con detergente y un posterior enjuagado con abundante agua de grifo.

En cambio, si contenía ácidos húmicos en muestras acuosas, antes de iniciar el protocolo general, se adicionaba hidróxido de potasio 0,1M para asegurar su eliminación.

4.4. Desarrollo experimental.

4.4.1. Procedimiento de microextracción con barras de disolvente.

En este trabajo se utilizó la técnica de microextracción en fase líquida con capilares de fibra hueca, en una configuración en barra de disolvente en 3 fases (3PSBME). Los dispositivos 3PSBME y su aplicación a los ensayos fueron llevados a cabo de la siguiente forma (imagen 1) [37]:

- 1) Se cortaron en segmentos de 5,4 cm de longitud usando una cuchilla.
- 2) Uno de los extremos de la fibra se selló térmicamente utilizando unas pinzas de punta plana y una punta caliente.
- 3) Por el otro extremo se introdujo la disolución receptora. Finalmente, se selló el extremo restante para confinar la disolución.
- 4) Los poros de los capilares se impregnaron con la disolución orgánica, por inmersión, de dPKBH disuelto en octanol.
- 5) Previo al uso de las fibras, el exceso de disolución orgánica en las paredes se lavó con agua Milli-Q. Por cada experimento se empleaban 6 fibras, repartidas en 2 botes de polietileno con la muestra.
- 6) Una vez preparados los botes se pusieron a agitar a la velocidad y tiempo que se estableciera en cada ensayo.
- 7) Finalizado el tiempo de agitación, se transfirió la disolución receptora de cada fibra al interior de un vial. Para ello se abre un extremo con ayuda de la cuchilla y se introduce dentro del vial. Seguidamente se abre el otro extremo y la disolución cae en el interior.
- 8) Para acabar el proceso, la determinación instrumental de las muestras recuperadas.

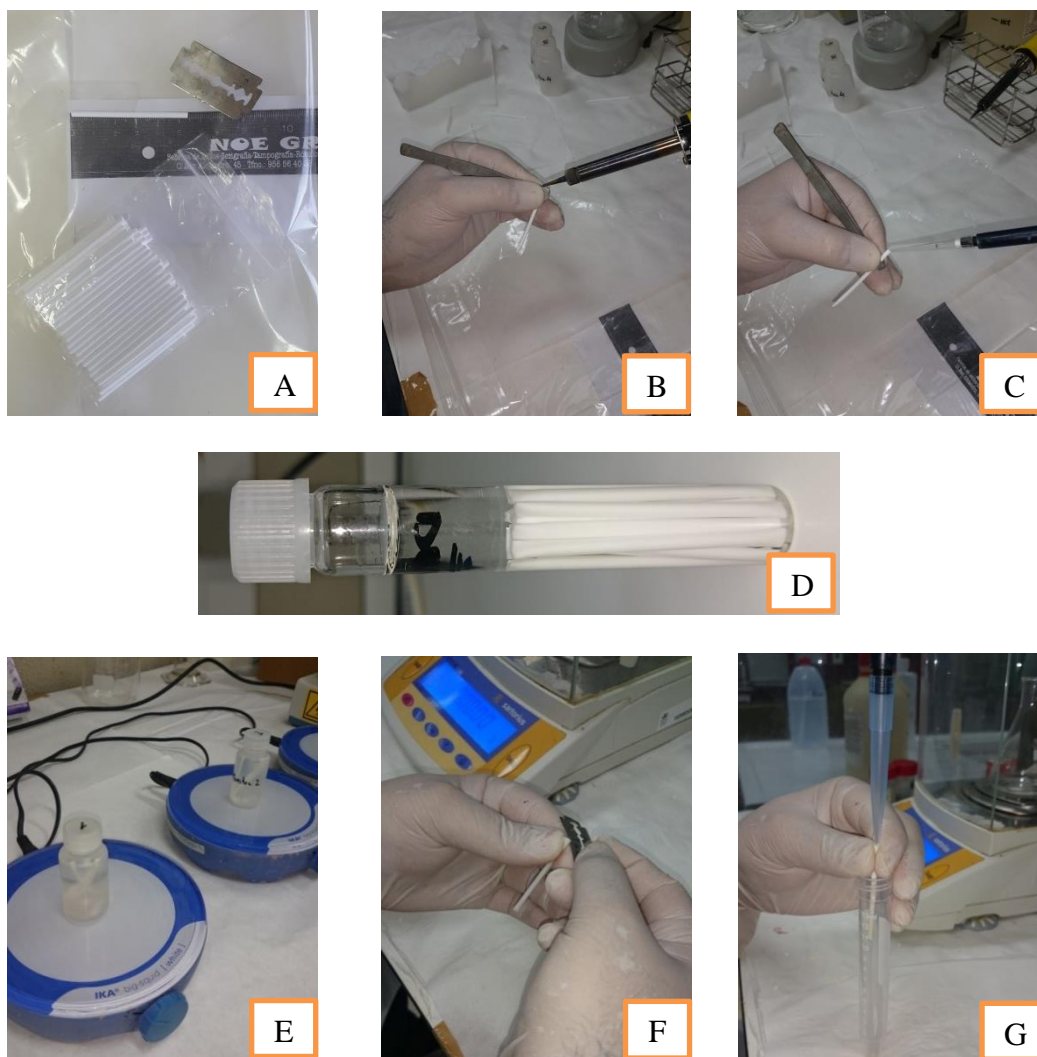


Imagen 1: diagrama de preparación del procedimiento de microextracción. (A) corte de fibra; (B) sellado térmico; (C) rellenado con disolución receptora; (D) impregnación de los poros; (E) microextracción del metal durante la agitación; (F) y (G) recuperación de la disolución receptora.

4.4.2. Determinación instrumental.

Las muestras fueron analizadas en un espectrofotómetro de absorción atómica de llama (FAAS). Las mediciones se realizaron a una longitud de onda (λ) de 324 nm, y midiendo entre los píxeles 98-102, ya que tiene un detector digital de estado sólido.

Para transformar la señal de absorbancia a concentración de cobre, fue preciso la realización de una curva de calibrado a partir del análisis de disoluciones con concentraciones de cobre exactamente conocidas.

4.4.3. Optimización.

Se partieron de condiciones químicas optimizadas para transporte de Cu^{2+} en HF-LPME utilizando la configuración en “U” [38]. Estas condiciones químicas se

trasladaron al sistema con configuración de 3PSBME, empleadas en todos los ensayos de este trabajo. Dichas condiciones son:

- En la muestra un pH 8, debido a que se pretende aplicar el sistema al análisis en agua de mar. Para conseguirlo, las muestras eran disoluciones 0,1M de HEPES como reactivo tampón, a las que se les adicionaba NaOH 2M en una proporción 1:25 en volumen.
- La disolución orgánica contiene dPKBH 0,01M disuelto en octanol. El dPKBH no es comercial, por lo que es preciso su síntesis previa, siguiendo el procedimiento descrito por García-Vargas y col. [39].
- La disolución receptora una disolución 0,5M de ácido nítrico (HNO_3). Debe ser ácida ya que el sistema funciona mediante el contra-transporte.

Todos los ensayos se llevaron a cabo con muestras que contenían $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Cu^{2+} , preparadas a partir de una dilución del patrón comercial de $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. El volumen de muestra de cada experimento fue de 35 mililitros por bote.

Sin embargo, al trasladar este sistema químico optimizado para la configuración en “U” a la configuración 3PBSME, se hizo una optimización de las condiciones hidrodinámicas antes de incorporar el líquido iónico $[\text{Hmim}][\text{PF}_6]$ a la disolución orgánica.

4.4.3.1. Optimización de las variables hidrodinámicas.

Las variables optimizadas fueron: tiempo de agitación, cuyos ensayos fueron entre 30 y 480 minutos a una velocidad fija, y velocidad de agitación donde los experimentos se realizaron entre 200 y 1000 rpm para un tiempo determinado.

4.4.3.2. Efecto de la inclusión del líquido iónico en la disolución orgánica.

Una vez optimizadas las condiciones hidrodinámicas para el sistema 3PBSME, se adicionó el líquido iónico a la disolución orgánica con dPKBH para evaluar su efecto sobre el transporte del metal.

Debido a la baja solubilidad del líquido iónico en la disolución orgánica fue necesario realizar estudios de solubilidad en octanol. Se recurrió a la adición del $[\text{Hmim}][\text{PF}_6]$ junto a otro disolvente: la dimetilformamida (DMF). Manteniendo fija una relación peso-volumen de 1% de $[\text{Hmim}][\text{PF}_6]$, se adicionaron entre 1 y 10% en volumen de DMF, en orden creciente hasta encontrar la concentración óptima para la completa solubilidad del $[\text{Hmim}][\text{PF}_6]$.

Una vez terminado, se realizaron estudios para la optimización de las condiciones químicas en la disolución orgánica:

- 1) Se evaluó el efecto de la DMF en el transporte del Cu^{2+} sin la presencia del $[\text{Hmim}][\text{PF}_6]$ en la disolución orgánica. Para ello, se realizaron ensayos a concentraciones de DMF entre 3,5 y 20% en volumen, junto con dPKBH.
- 2) Posteriormente, se estudió la influencia del líquido iónico en el transporte del metal. Los ensayos fueron a concentraciones de $[\text{Hmim}][\text{PF}_6]$ entre 0,01 y 0,5% en peso-volumen, junto con las concentraciones óptimas de dPKBH y DMF.

Para poder evaluar la eficacia de la preconcentración y poder optimizar las diferentes variables, se utilizó el factor de enriquecimiento (F.E.) (ecuación 1). Esta muestra la relación entre la concentración del analito que se halla en el interior del capilar, y la concentración inicial que había en la muestra.

$$F.E. = \frac{[\text{Cu}^{2+}]_{\text{receptora}}}{[\text{Cu}^{2+}]_{\text{cargada}}} \quad (\text{Ecuación 1})$$

4.4.4. Efecto de la salinidad y de la materia orgánica.

Como se ha comentado anteriormente, una limitación de los sistemas químicos existentes es su aplicabilidad a muestras salinas, por eso se evalúa el efecto de la salinidad en la muestra para el sistema químico empleado en este trabajo. Se realizaron experimentos a concentraciones entre 5 y 35 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaCl en la muestra, manteniendo un pH 8.

De igual forma, se evaluó el efecto de la materia orgánica en la muestra. Se realizaron estudios a concentraciones entre 1 y 30 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácidos húmicos (AH) en la muestra, conservando en todo momento pH 8. La concentración de materia orgánica o Carbono Orgánico Disuelto (COD) se corresponde a 1/3 de la concentración de ácidos húmicos en la muestra.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Estudios preliminares.

Se realizaron diversos ensayos preliminares para corroborar la estabilidad y reproducibilidad del sistema 3PSBME. Para ello, se elaboraron dispositivos 3PSBME en los que se determinó la media de recuperación de disolución receptora después de un proceso de extracción. De los capilares se recuperó una media de $88,71 \pm 1,51 \mu\text{L}$ para un total de 12 fibras.

5.2. Optimización de las variables hidrodinámicas.

A continuación se exponen los resultados obtenidos de los ensayos realizados para la optimización del tiempo y de la velocidad de agitación al sistema químico de partida.

5.2.1. Tiempo de agitación.

Como se puede observar, el factor de enriquecimiento aumenta progresivamente con el tiempo, hasta el máximo de 480 minutos con un valor de $101 \pm 2,69$ (figura 4). El crecimiento es más pronunciado hasta los 240 minutos, a partir del cual la pendiente comienza a decrecer. No se estudió más allá de los 480 minutos porque ya se tratan de tiempos excesivos y hace que el sistema pierda aplicabilidad.

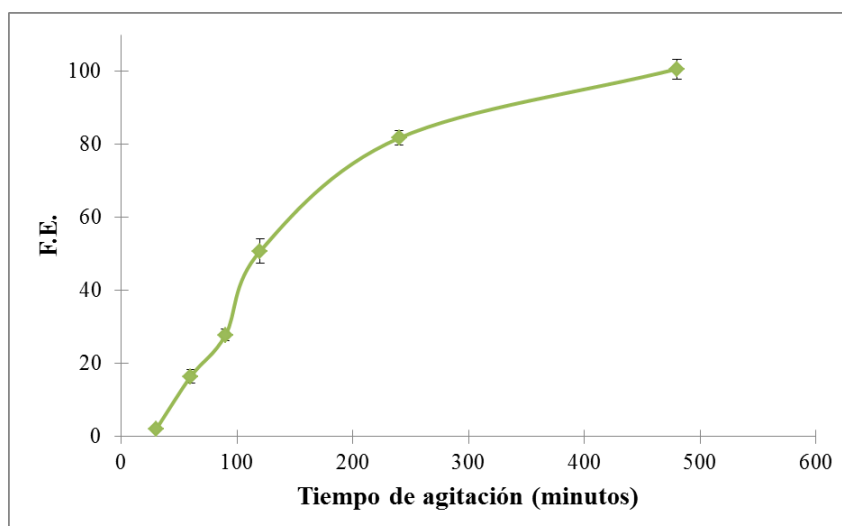


Figura 4. Variación del F.E. en función del tiempo de agitación.

Aunque de todos los tiempos estudiados, encontrándose el máximo de preconcentración en los 480 minutos, el tiempo que se considera para el resto de

ensayos es a 120 minutos. Esto se debe a que se obtiene suficiente preconcentración de Cu^{2+} ($51 \pm 3,39$) para ser cuantificable.

5.2.2. Velocidad de agitación.

Se aprecia que el F.E. aumenta con la velocidad, alcanzando un máximo a 500 rpm con un valor de $56,30 \pm 1,83$ (figura 5), considerándose como el óptimo de velocidad. Posteriormente, desciende la eficacia para mantenerse constante a velocidades mayores.

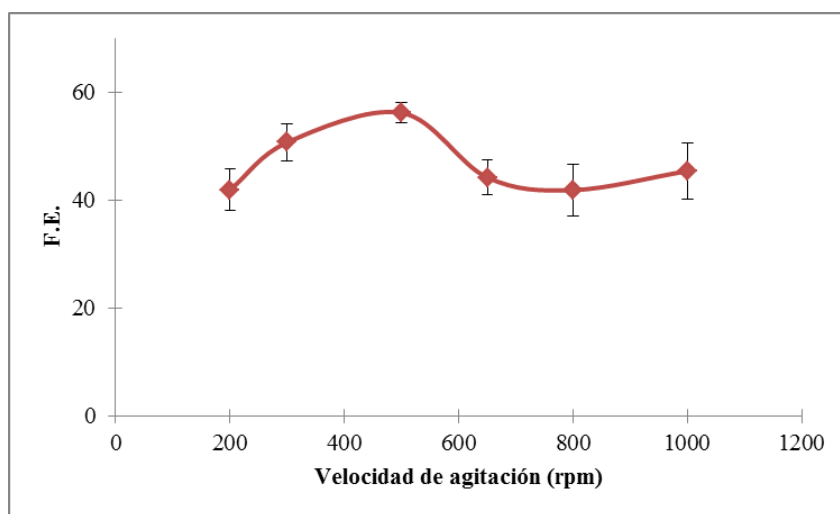


Figura 5. Variación del F.E. en función de la velocidad de agitación.

Al aumentar la velocidad de agitación se incrementa el F.E., ya que se favorece el contacto de más iones de cobre en la muestra con las fibras. Sin embargo, este comportamiento tiene un máximo a las 500 rpm. Esto es debido a que las altas velocidades provocan que se desprenda la membrana líquida de los poros de la fibra, y por tanto afecta a la cantidad de agente extractante disponible en el capilar, lo que también produce el aumento de la dispersión de los resultados a velocidades mayores.

Habiendo concluido los ensayos para la optimización de las condiciones hidrodinámicas, los restantes experimentos se realizaron a 120 minutos y 500 rpm.

5.3. Efecto de la inclusión del líquido iónico en la disolución orgánica.

Una vez optimizadas las condiciones hidrodinámicas del sistema de partida, se introdujo el líquido iónico [Hmim][PF₆] formando parte de la disolución orgánica.

5.3.1. Estudios de solubilidad del líquido iónico.

Debido a la alta polaridad del [Hmim][PF₆], no era posible su disolución en octanol. Fue necesaria una adición conjunta con DMF para aumentar la polaridad de la disolución orgánica y conseguir disolver el líquido iónico en el seno de la disolución.

Para el estudio de solubilidad del líquido iónico en octanol se determinó que el volumen mínimo al que se disolvía completamente el porcentaje fijo de líquido iónico adicionado era al 7% en volumen de DMF.

5.3.2. Condiciones en la disolución orgánica.

Para evaluar correctamente el efecto potenciador del [Hmim][PF₆] en el transporte del cobre, se comprobó primero si la DMF por sí sola afecta a la preconcentración del metal. Como se puede ver en la figura 6, se aprecia un aumento del F.E. con respecto al aumento de la concentración de DMF.

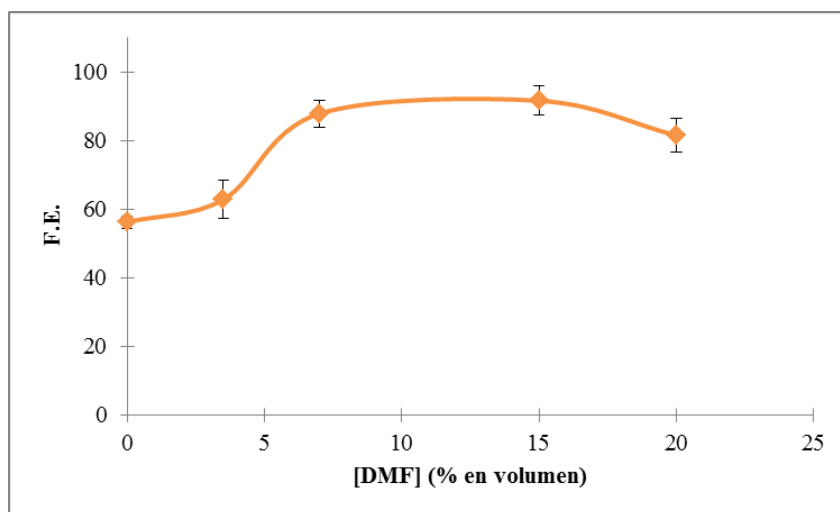


Figura 6. Efecto de adición de DMF al F.E. en función de la concentración.

Se puede observar que la preconcentración va en aumento con la concentración de DMF, alcanzando un máximo entre 7 y 15% de DMF con F.E. de $91,68 \pm 4,21$ y cayendo ligeramente al 20%.

Respecto al sistema químico de partida, representado como el 0% de DMF, se aprecia un aumento destacable. Esto es debido a que la DMF permite mejor difusión de los complejos Cu-dPKBH hacia el interior de la fibra, como consecuencia de un aumento de la polaridad.

Finalmente, se considera como volumen óptimo la adición al 7% de DMF. A esa concentración se consigue el F.E. óptimo para el sistema de extracción de Cu²⁺, además

de tratarse del volumen mínimo necesario para asegurarnos la completa disolución del líquido iónico.

5.3.2.1. Concentración del líquido iónico [Hmim][PF₆].

Una vez conocida la concentración óptima de DMF, se estudió la influencia del [Hmim][PF₆] sobre el F.E. Para ello, la disolución orgánica estuvo compuesta por dPKBH 0,01M, con una adición al 7% en volumen de DMF. Los datos obtenidos de los ensayos realizados para diferentes concentraciones de líquido iónico están representados en la figura 7.

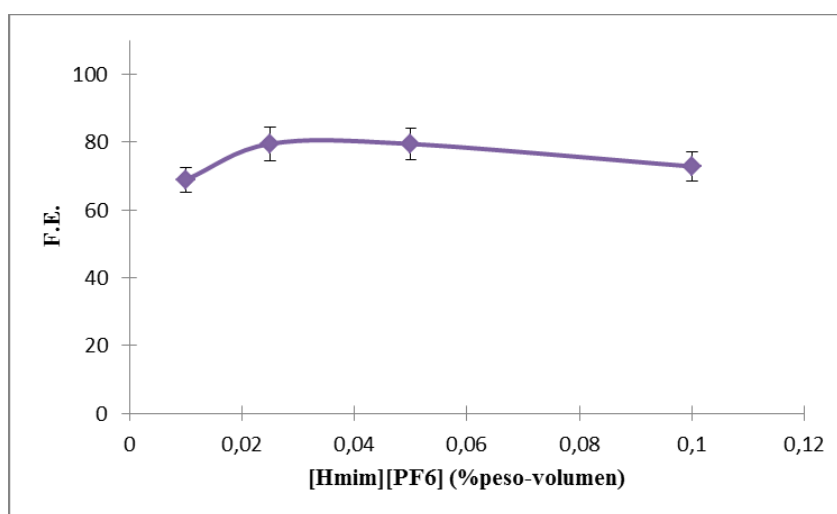


Figura 7. Efecto [Hmim][PF₆] en el F.E. en función de la concentración.

Las concentraciones de líquido iónico empleadas en estos ensayos son iguales y superiores a las publicadas en otros trabajos con líquidos iónicos. Como se dijo anteriormente, los ensayos se realizaron a concentraciones de [Hmim][PF₆] entre 0,01 y 0,5% en peso-volumen. No se observan los puntos correspondientes a concentraciones superiores a 0,1% peso-volumen ya que durante el proceso de impregnación de los capilares, las altas concentraciones de líquido iónico formaba una red cristalina alrededor del capilar. Esto hace que no se pudiera aplicar el sistema a altas concentraciones de [Hmim][PF₆].

En cuanto a los datos representados, se puede observar que el F.E. aumenta ligeramente con la concentración de líquido iónico, hasta alcanzar un máximo a 0,025% con un valor de $79,46 \pm 4,98$ a partir de cual comienza a decrecer muy levemente. Esta disolución orgánica es la que se consideró en estudios posteriores.

Sin embargo, no se observa mejora con respecto al sistema sin líquido iónico. Puesto que la disolución orgánica que presenta líquido iónico contiene además DMF, la eficiencia del transporte sólo puede ser comparada con el sistema químico que contiene DMF, no con el sistema químico de partida.

5.4. Efecto de la salinidad y de la materia orgánica.

El siguiente paso fue utilizar cada una de las distintas disoluciones orgánicas para ver su eficacia ante muestras de diferentes características, ya que hasta el momento se emplearon muestras en las que sólo había iones de cobre libres (Cu^{2+}). El objetivo era determinar el efecto que produce la salinidad y la materia orgánica de las muestras en el transporte de cobre. Se mantienen el valor de pH 8 y las condiciones óptimas de tiempo y velocidad de agitación.

Por tanto, los siguientes ensayos se realizaron con 3 disoluciones orgánicas ($D_{\text{org.}}$) diferentes en sus correspondientes condiciones químicas óptimas. La $D_{\text{org.1}}$ corresponde al sistema químico de partida. La $D_{\text{org.2}}$ y $D_{\text{org.3}}$ corresponden a disoluciones orgánicas en ausencia y en presencia de líquido iónico respectivamente, ambas con DMF y dPKBH.

5.4.1. Efecto de la salinidad en la muestra.

Teniendo en cuenta que muchos de los sistemas de microextracción tienen limitada aplicabilidad en agua de mar, se comprobó el efecto de la salinidad sobre el F.E. de cobre tanto en presencia como en ausencia de $[\text{Hmim}][\text{PF}_6]$. El objetivo era observar si el líquido iónico tiene un efecto positivo en la preconcentración.

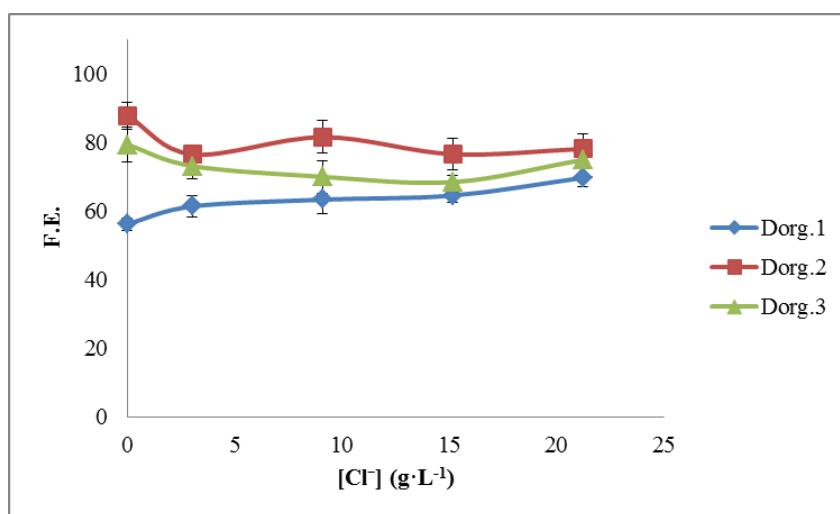


Figura 8. Efecto de la concentración de cloruros (Cl^-) para cada disolución orgánica.

No se observan cambios importantes en el F.E. ante la presencia de cloruros en ninguno de los casos. Esto quiere decir que la preconcentración es independiente de la salinidad de la muestra (figura 8).

Se mantienen las diferencias relativas entre las distintas disoluciones orgánicas para todo el recorrido de concentraciones de cloruros, siendo mejor $D_{org.2}$ que $D_{org.3}$, y este mejor que $D_{org.1}$. Es decir, la $D_{org.2}$ en ausencia de líquido iónico presenta un mejor F.E. que la $D_{org.3}$ que sí contiene el líquido iónico. Por tanto, la presencia de líquido iónico en la disolución orgánica no tiene efecto en la preconcentración.

Finalmente, se puede decir que la presencia de cloruros no afecta a la eficiencia de transporte, por lo que cabe la posibilidad de su uso en muestras de agua de mar sin perder eficacia de preconcentración.

5.4.2. Efecto de la materia orgánica en la muestra.

Los resultados obtenidos de los experimentos realizados a diferentes concentraciones de ácidos húmicos para evaluar su efecto sobre los distintos sistemas químicos se muestran en la figura 9.

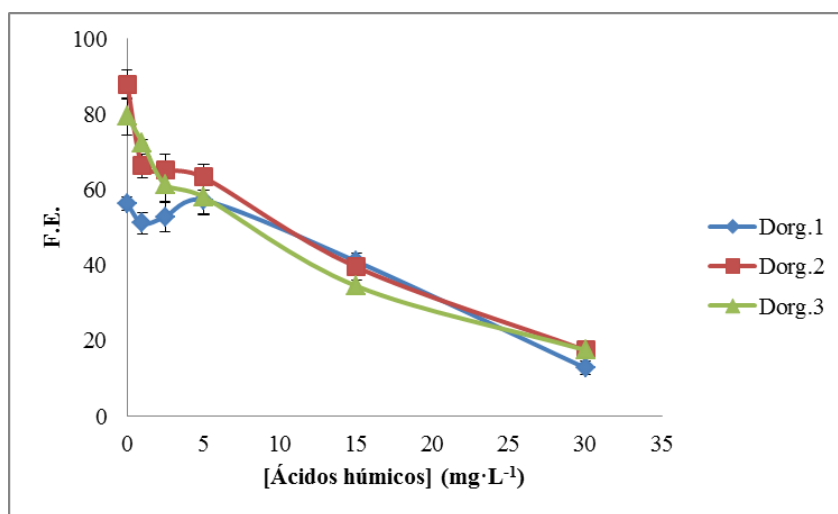


Figura 9. Efecto de la concentración de ácidos húmicos para cada disolución orgánica.

El comportamiento general que se describe es que la presencia de los ácidos húmicos afecta al F.E. en los tres sistemas, disminuyendo el F.E. a medida que se va aumentando la concentración en la muestra. Se mantienen las diferencias relativas entre la presencia y la ausencia de líquido iónico en la disolución orgánica, igual que en el caso de los cloruros. La pérdida de eficacia no es solventado con $[Hmim][PF_6]$.

Esta caída de eficiencia es debida a que la materia orgánica (MO) reacciona con el cobre de la muestra, formando complejos lo suficientemente estables que el dPKBH no es capaz de romper. Esto provoca que parte del cobre permanezca en el seno de la muestra y solo el Cu^{2+} pueda extraerse.

5.4.2.1. Estudio de aplicación en la especiación de cobre.

Si bien la disminución del factor de enriquecimiento con la presencia de materia orgánica podría ser considerada un efecto negativo, ésta puede utilizarse para el estudio de especiación de cobre. Para este estudio, se usa el sistema químico sin líquido iónico ($D_{\text{org.2}}$) ya que se ha comprobado que afecta al transporte en las condiciones anteriormente estudiadas.

La disminución del F.E. en función de la concentración de Carbono Orgánico Disuelto (COD) puede cuantificarse, lo que hace que se pueda aplicar al estudio de especiación, ya que el dPKBH transporta selectivamente Cu^{2+} . De hecho, existe una relación lineal entre el $\text{Log}(\text{F.E.})$ y la concentración COD (figura 10). Dicha relación lineal ofrece un R^2 de 0,9979.

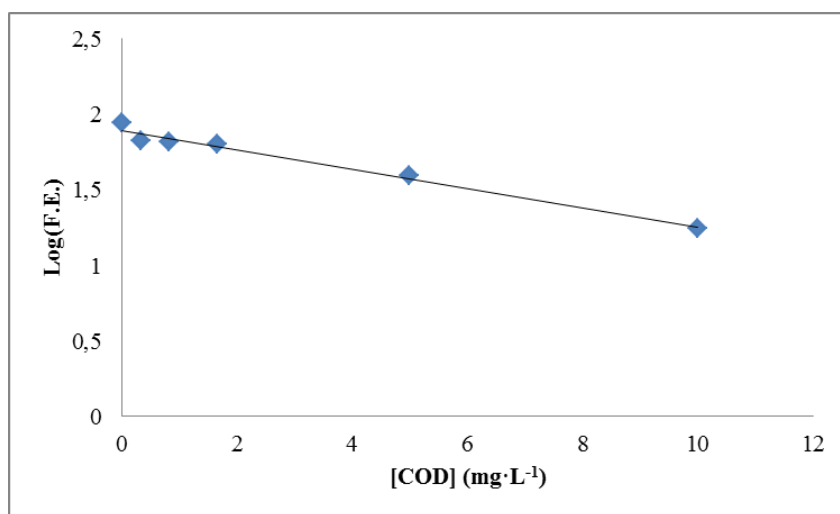


Figura 10. Ajuste lineal del $\log(\text{F.E.})$ respecto a la concentración COD.

Esta relación lineal permite predecir el F.E. que se puede obtener en muestras donde se conozca la concentración COD (ecuación 2) [29].

$$\text{Log}(FE_p) = 1,8942 - 0,0643[\text{COD}] \quad (\text{Ecuación 2})$$

Además, conociendo el F.E. óptimo que se consigue con el sistema (Cu^{2+}) y el F.E. predicho (FE_p) obtenido de la regresión anterior para una muestra de la que se conoce el COD, se puede estimar la concentración de cobre total (Cu_t) en dicha muestra (ecuación 3) [29].

$$\text{Cu}_t = \frac{\text{Cu}^{2+}}{\text{FE}_p} \quad (\text{Ecuación 3})$$

Finalmente, el cobre total (Cu_t) se puede considerar como la suma de la fracción inerte (Cu_i) constituida por los complejos Cu-MO, que no se transporta a través de la fase orgánica, y el cobre libre (Cu^{2+}) que puede ser transportado al interior del capilar, lográndose de esta forma la especiación de cobre dentro de la muestra (ecuación 4) [29].

$$\text{Cu}_t = \text{Cu}^{2+} + \text{Cu}_i \quad (\text{Ecuación 4})$$

6. CONCLUSIONES

A la vista de los resultados obtenidos de los diferentes ensayos, se determina que el uso de [Hmim][PF₆] como aditivo a la disolución orgánica con dPKBH en un sistema 3PSBME para la microextracción de cobre en muestras acuosas, no tiene un efecto potenciador en el transporte. Se fundamenta a través de las siguientes conclusiones:

- Las condiciones hidrodinámicas establecidas para el sistema químico de partida en el sistema de 3PSBME fueron a un tiempo y velocidad de agitación de 120 minutos y 500 rpm respectivamente.
- El líquido iónico [Hmim][PF₆] no tiene efecto sobre el transporte de Cu²⁺ con dPKBH.
- La presencia de cloruros en las muestras no tiene efecto sobre el transporte de cobre presentando aplicabilidad en el análisis de muestras de agua de mar, mientras que el F.E. disminuye con la materia orgánica, lo que se ha aprovechado para el estudio de especiación de cobre.

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] K. W. Bruland, *Trace elements in sea-water*, vol. 8. 1983.
- [2] A. Oren, "Biogeochemical Cycles," *eLS*, no. 2, pp. 1–7, 2001.
- [3] E. J. Martínez-Finley, S. Chakraborty, S. J. B. Fretham, and M. Aschner, "Cellular transport and homeostasis of essential and nonessential metals," *Metallomics*, pp. 593–605, 2012.
- [4] K. Nogawa and T. Kido, "Biological monitoring of cadmium exposure in itai-itai disease epidemiology," *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, vol. 65, no. 1 Supplement, 1993.
- [5] P. Katavolos, S. Staempfli, W. Sears, A. Y. Gancz, D. A. Smith, and D. Bienzle, "The effect of lead poisoning on hematologic and biochemical values in trumpeter swans and Canada geese," *Vet. Clin. Pathol.*, vol. 36, no. 4, pp. 341–347, 2007.
- [6] D. Mackay, A. K. D. Celsie, J. A. Arnot, and D. E. Powell, "Processes influencing chemical biomagnification and trophic magnification factors in aquatic ecosystems: Implications for chemical hazard and risk assessment," *Chemosphere*, vol. 154, pp. 99–108, 2016.
- [7] O. M. Alarcón-Corredor, "Los elementos traza," *Rev. Médica la Extensión Port. - ULA*, vol. 4, no. 3, pp. 107–124, 2009.
- [8] L. E. Brand, W. G. Sunda, and R. R. L. Guillard, "Reduction of marine phytoplankton reproduction rates by copper and cadmium," *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.*, vol. 96, no. 3, pp. 225–250, 1986.
- [9] Z. L. Harris and J. D. Gitlin, "Genetic and molecular basis for copper toxicity," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 63, no. 5, p. 836S–41S, 1996.
- [10] U. Europea, "Directiva 2008/105/CE. Relativa a las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas," *D. Of. la Unión Eur.*, vol. 348, pp. 84–97, 2008.
- [11] R. Eisler, *Copper on Handbook of chemical risk assessment. Health hazards to humans, plants and animals*. 2000.
- [12] C. Mendiguchía, C. Moreno, and M. García-Vargas, "Determination of copper in seawater based on a liquid membrane preconcentration system," *Anal. Chim. Acta*, vol. 460, no. 1, pp. 35–40, 2002.
- [13] J. F. Wu and E. A. Boyle, "Lead in the western North Atlantic Ocean: Completed

- response to leaded gasoline phaseout,” *Geochim. Cosmochim. Acta*, vol. 61, no. 15, pp. 3279–3283, 1997.
- [14] T. Dasbasi, S. Sacmaci, S. Sahan, S. Kartal, and A. Ulgen, “Synthesis, characterization and application of a new chelating resin for on-line separation, preconcentration and determination of Ag(I) by flame atomic absorption spectrometry,” *Talanta*, vol. 103, no. 1873–3573 (Electronic), pp. 1–7, 2013.
 - [15] T. Y. Ho, C. Te Chien, B. N. Wang, and A. Siriraks, “Determination of trace metals in seawater by an automated flow injection ion chromatograph pretreatment system with ICPMS,” *Talanta*, vol. 82, no. 4, pp. 1478–1484, 2010.
 - [16] C. I. C. Silvestre, J. L. M. Santos, J. L. F. C. Lima, and E. A. G. Zagatto, “Liquid-liquid extraction in flow analysis: A critical review,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 652, no. 1–2, pp. 54–65, 2009.
 - [17] K. W. Bruland, R. P. Franks, G. A. Knauer, and J. H. Martin, “Sampling and analytical methods for the determination of copper, cadmium, zinc, and nickel at the nanogram per liter level in sea water,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 105, no. C, pp. 233–245, 1979.
 - [18] L. A. Miller and K. W. Bruland, “Determination of copper speciation in marine waters by competitive ligand equilibration/liquid - liquid extraction: An evaluation of the technique,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 284, no. 3, pp. 573–586, 1994.
 - [19] P. T. Anastas and J. C. Warner, *Green Chemistry: Theory and Practise*. Oxford: Oxford University Press, 1998.
 - [20] A. Spietelun, Ł. Marcinkowski, M. De La Guardia, and J. Namieśnik, “Green aspects, developments and perspectives of liquid phase microextraction techniques,” *Talanta*, vol. 119, pp. 34–45, 2014.
 - [21] F. Pena-Pereira, I. Lavilla, and C. Bendicho, “Miniaturized preconcentration methods based on liquid-liquid extraction and their application in inorganic ultratrace analysis and speciation: A review,” *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.*, vol. 64, no. 1, pp. 1–15, 2009.
 - [22] R. D. Noble and J. D. Way, “Liquid Membranes. Theory and Applications.” American Chemical Society, Washington, 1987.
 - [23] J. A. López-López, B. Herce-Sesa, and C. Moreno, “Three-phase solvent bar micro-extraction as an approach to silver ultra-traces speciation in estuarine water samples,” *Talanta*, vol. 132, pp. 382–386, 2015.

- [24] B. Welz and M. Sperling, "Atomic Absorption Spectrometry," pp. 1–13, 1998.
- [25] F. Pena-Pereira, I. Lavilla, and C. Bendicho, "Liquid-phase microextraction techniques within the framework of green chemistry," *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 29, no. 7, pp. 617–628, 2010.
- [26] J. J. Pinto, M. Martín, B. Herce-Sesa, J. A. López-López, and C. Moreno, "Solvent bar micro-extraction: Improving hollow fiber liquid phase micro-extraction applicability in the determination of Ni in seawater samples," *Talanta*, vol. 142, pp. 84–89, 2015.
- [27] J. Pinto-Ganformina, "Nuevas alternativas para la simplificación y mejora de análisis de metales pesados en muestras ambientales," 2008.
- [28] G. Albendín, J. A. López-López, and J. J. Pinto, "Miniaturized and direct spectrophotometric multi-sample analysis of trace metals in natural waters," *Anal. Biochem.*, vol. 497, pp. 18–23, 2016.
- [29] J. A. López-López, B. Herce-Sesa, and C. Moreno, "Three-phase solvent bar micro-extraction as an approach to silver ultra-traces speciation in estuarine water samples," *Talanta*, vol. 132, pp. 382–386, 2015.
- [30] V. Vičkačkaite and A. Padarauskas, "Ionic liquids in microextraction techniques," *Cent. Eur. J. Chem.*, vol. 10, no. 3, pp. 652–674, 2012.
- [31] P. Zhang, L. Hu, R. Lu, W. Zhou, and H. Gao, "Application of ionic liquids for liquid–liquid microextraction," *Anal. Methods*, vol. 5, no. 20, pp. 5376–5385, 2013.
- [32] E. Stanis, J. Werner, and A. Zgoła-Grześkowiak, "Liquid-phase microextraction techniques based on ionic liquids for preconcentration and determination of metals," *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 61, pp. 54–66, 2014.
- [33] J. Abulhassani, J. L. Manzoori, and M. Amjadi, "Hollow fiber based-liquid phase microextraction using ionic liquid solvent for preconcentration of lead and nickel from environmental and biological samples prior to determination by electrothermal atomic absorption spectrometry," *J. Hazard. Mater.*, vol. 176, no. 1–3, pp. 481–486, 2010.
- [34] Y. Liu, Y. Wang, Y. Hu, L. Ni, J. Han, T. Chen, H. Chen, and Y. Liu, "Ionic liquid-based hollow fiber liquid-phase microextraction for the determination of trace lead (II) in environmental water and tea drinks samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry," *J. Iran. Chem. Soc.*, vol. 12, no. 3, pp. 371–377, 2015.

- [35] Z. Al Othman, Y. E. Unsal, M. Habila, A. Shabaka, M. Tuzen, and M. Soylak, "Determination of Copper in Food and Water by Dispersive Liquid-Liquid Microextraction and Flame Atomic Absorption Spectrometry," *Anal. Lett.*, vol. 48, no. 11, pp. 1738–1750, 2015.
- [36] M. Liu, J. Che, W. Wu, Y. Lu, C. Peng, H. Liu, H. Lu, Q. Yang, and H. Wang, "Extraction of Copper from Aqueous Solution with Functional Ionic Liquids: Experiment and Theoretical Calculation," *Acta Chim. Sin.*, vol. 73, no. 2, p. 116, 2015.
- [37] C. López-López, J.A.; Pinto, J.J.; Mendiguchía, C.; Vergel, C.; Manuel, M.V.; Moreno, "Spanish Patent Application," 201300122.
- [38] M. A. Varela Pérez, "Miniaturización de los sistemas de preparación de muestras. análisis de cobre en agua de mar," 2015.
- [39] M. García-Vargas, M. Belizón, M. P. Hernández-Artiga, C. Martínez, and J. A. Pérez-Bustamante, "Ligands with the 'ONNN' Group as Chelating and Preconcentrating Substances of Heavy Metal Ions: Aroylhydrazone Derivatives from Di-2-Pyridyl Ketone," *Appl. Spectrosc.*, vol. 40, no. 7, pp. 1058–1062, 1986.